

10/534128

JC06 Rec'd PCT/PTO 06 MAY 2005

✓ 1. GENE ORE4 REGULATING LEAF LONGEVITY IN ARABIDOPSIS THALIANA AND MUTANT GENES THEREOF

Abstract : PURPOSE: A gene ORE4 regulating leaf longevity in *Arabidopsis thaliana* and a mutant gene thereof are provided, thereby improving the productivity and storageability of plants.

CONSTITUTION: ORE4 gene and its protein which regulate leaf longevity have amino acid sequence of SEQ ID NO. 1 and is isolated from *Arabidopsis thaliana*. The recombinant vector pGTE-ORE4 (KCTC 10037BP) comprises gene ORE4. The plant longevity-regulating genes or proteins...

Publication No. : A 1020010099065(20011109)  Fulltext

IPC : C12N 15/29

Applicant : POSTECH FOUNDATION

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
C12N 15/29

(45) 공고일자 2004년07월02일
(11) 등록번호 10-0438887
(24) 등록일자 2004년06월24일

(21) 출원번호 10-2001-0050748
(22) 출원일자 2001년08월22일

(65) 공개번호 10-2001-0099065
(43) 공개일자 2001년11월09일

(73) 특허권자 학교법인 포항공과대학교
경북 포항시 남구 효자동 산31번지

(72) 발명자 남홍길
경상북도포항시남구효자동31

우혜련
경상북도포항시남구지곡동133기숙사(박사과정)1502호

박준현
미합중국85712아리조나주투산시노스콜러미스블러바드3401아파트4호

(74) 대리인 이영필
이해영

심사관 : 백경업

(54) 애기장대로부터 분리한 식물의 잎 수명 조절 유전자 ORE4 및 그 변이형 유전자

요약

본 발명은 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 잎 수명 조절 유전자 *ORE4*, 상기 유전자의 돌연변이형으로서 식물의 노화와 관련된 각종 생리적, 생화학적 변화를 억제하여 식물의 수명을 연장하는 변이형 유전자 *ore4* 및 이들 유전자의 이용에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 잎 수명 조절 유전자 및 그 변이형 유전자를 이용하여 수명 연장을 통한 식물의 생산성 향상 및 저장 효율을 증대할 수 있으며, 식물의 수명 조절에 관련된 유전자 또는 식물 노화 억제 물질을 탐색하기 위한 생체 표지 개발에 상기 유전자들을 이용할 수 있다.

대표도

도 5a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 애기장대 야생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*의 표현형으로서 발아 후 41 일(도 1a) 및 53 일(도 1b)에서의 전체 식물과 4번째 좌엽을 나타낸 사진이고,

도 2a는 애기장대 야생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에서 광합성 활성의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이고 (광 핵서 향상 O 대비로 광합성 능률이 1.12, 1.15, 1.18, 1.21, 1.24, 1.27, 1.30, 1.33, 1.36, 1.39, 1.42, 1.45, 1.48, 1.51, 1.54, 1.57, 1.60, 1.63, 1.66, 1.69, 1.72, 1.75, 1.78, 1.81, 1.84, 1.87, 1.90, 1.93, 1.96, 1.99, 2.02, 2.05, 2.08, 2.11, 2.14, 2.17, 2.20, 2.23, 2.26, 2.29, 2.32, 2.35, 2.38, 2.41, 2.44, 2.47, 2.50, 2.53, 2.56, 2.59, 2.62, 2.65, 2.68, 2.71, 2.74, 2.77, 2.80, 2.83, 2.86, 2.89, 2.92, 2.95, 2.98, 3.01, 3.04, 3.07, 3.10, 3.13, 3.16, 3.19, 3.22, 3.25, 3.28, 3.31, 3.34, 3.37, 3.40, 3.43, 3.46, 3.49, 3.52, 3.55, 3.58, 3.61, 3.64, 3.67, 3.70, 3.73, 3.76, 3.79, 3.82, 3.85, 3.88, 3.91, 3.94, 3.97, 4.00, 4.03, 4.06, 4.09, 4.12, 4.15, 4.18, 4.21, 4.24, 4.27, 4.30, 4.33, 4.36, 4.39, 4.42, 4.45, 4.48, 4.51, 4.54, 4.57, 4.60, 4.63, 4.66, 4.69, 4.72, 4.75, 4.78, 4.81, 4.84, 4.87, 4.90, 4.93, 4.96, 4.99, 5.02, 5.05, 5.08, 5.11, 5.14, 5.17, 5.20, 5.23, 5.26, 5.29, 5.32, 5.35, 5.38, 5.41, 5.44, 5.47, 5.50, 5.53, 5.56, 5.59, 5.62, 5.65, 5.68, 5.71, 5.74, 5.77, 5.80, 5.83, 5.86, 5.89, 5.92, 5.95, 5.98, 6.01, 6.04, 6.07, 6.10, 6.13, 6.16, 6.19, 6.22, 6.25, 6.28, 6.31, 6.34, 6.37, 6.40, 6.43, 6.46, 6.49, 6.52, 6.55, 6.58, 6.61, 6.64, 6.67, 6.70, 6.73, 6.76, 6.79, 6.82, 6.85, 6.88, 6.91, 6.94, 6.97, 7.00, 7.03, 7.06, 7.09, 7.12, 7.15, 7.18, 7.21, 7.24, 7.27, 7.30, 7.33, 7.36, 7.39, 7.42, 7.45, 7.48, 7.51, 7.54, 7.57, 7.60, 7.63, 7.66, 7.69, 7.72, 7.75, 7.78, 7.81, 7.84, 7.87, 7.90, 7.93, 7.96, 7.99, 8.02, 8.05, 8.08, 8.11, 8.14, 8.17, 8.20, 8.23, 8.26, 8.29, 8.32, 8.35, 8.38, 8.41, 8.44, 8.47, 8.50, 8.53, 8.56, 8.59, 8.62, 8.65, 8.68, 8.71, 8.74, 8.77, 8.80, 8.83, 8.86, 8.89, 8.92, 8.95, 8.98, 9.01, 9.04, 9.07, 9.10, 9.13, 9.16, 9.19, 9.22, 9.25, 9.28, 9.31, 9.34, 9.37, 9.40, 9.43, 9.46, 9.49, 9.52, 9.55, 9.58, 9.61, 9.64, 9.67, 9.70, 9.73, 9.76, 9.79, 9.82, 9.85, 9.88, 9.91, 9.94, 9.97, 10.00, 10.03, 10.06, 10.09, 10.12, 10.15, 10.18, 10.21, 10.24, 10.27, 10.30, 10.33, 10.36, 10.39, 10.42, 10.45, 10.48, 10.51, 10.54, 10.57, 10.60, 10.63, 10.66, 10.69, 10.72, 10.75, 10.78, 10.81, 10.84, 10.87, 10.90, 10.93, 10.96, 10.99, 11.02, 11.05, 11.08, 11.11, 11.14, 11.17, 11.20, 11.23, 11.26, 11.29, 11.32, 11.35, 11.38, 11.41, 11.44, 11.47, 11.50, 11.53, 11.56, 11.59, 11.62, 11.65, 11.68, 11.71, 11.74, 11.77, 11.80, 11.83, 11.86, 11.89, 11.92, 11.95, 11.98, 12.01, 12.04, 12.07, 12.10, 12.13, 12.16, 12.19, 12.22, 12.25, 12.28, 12.31, 12.34, 12.37, 12.40, 12.43, 12.46, 12.49, 12.52, 12.55, 12.58, 12.61, 12.64, 12.67, 12.70, 12.73, 12.76, 12.79, 12.82, 12.85, 12.88, 12.91, 12.94, 12.97, 13.00, 13.03, 13.06, 13.09, 13.12, 13.15, 13.18, 13.21, 13.24, 13.27, 13.30, 13.33, 13.36, 13.39, 13.42, 13.45, 13.48, 13.51, 13.54, 13.57, 13.60, 13.63, 13.66, 13.69, 13.72, 13.75, 13.78, 13.81, 13.84, 13.87, 13.90, 13.93, 13.96, 13.99, 14.02, 14.05, 14.08, 14.11, 14.14, 14.17, 14.20, 14.23, 14.26, 14.29, 14.32, 14.35, 14.38, 14.41, 14.44, 14.47, 14.50, 14.53, 14.56, 14.59, 14.62, 14.65, 14.68, 14.71, 14.74, 14.77, 14.80, 14.83, 14.86, 14.89, 14.92, 14.95, 14.98, 15.01, 15.04, 15.07, 15.10, 15.13, 15.16, 15.19, 15.22, 15.25, 15.28, 15.31, 15.34, 15.37, 15.40, 15.43, 15.46, 15.49, 15.52, 15.55, 15.58, 15.61, 15.64, 15.67, 15.70, 15.73, 15.76, 15.79, 15.82, 15.85, 15.88, 15.91, 15.94, 15.97, 16.00, 16.03, 16.06, 16.09, 16.12, 16.15, 16.18, 16.21, 16.24, 16.27, 16.30, 16.33, 16.36, 16.39, 16.42, 16.45, 16.48, 16.51, 16.54, 16.57, 16.60, 16.63, 16.66, 16.69, 16.72, 16.75, 16.78, 16.81, 16.84, 16.87, 16.90, 16.93, 16.96, 16.99, 17.02, 17.05, 17.08, 17.11, 17.14, 17.17, 17.20, 17.23, 17.26, 17.29, 17.32, 17.35, 17.38, 17.41, 17.44, 17.47, 17.50, 17.53, 17.56, 17.59, 17.62, 17.65, 17.68, 17.71, 17.74, 17.77, 17.80, 17.83, 17.86, 17.89, 17.92, 17.95, 17.98, 18.01, 18.04, 18.07, 18.10, 18.13, 18.16, 18.19, 18.22, 18.25, 18.28, 18.31, 18.34, 18.37, 18.40, 18.43, 18.46, 18.49, 18.52, 18.55, 18.58, 18.61, 18.64, 18.67, 18.70, 18.73, 18.76, 18.79, 18.82, 18.85, 18.88, 18.91, 18.94, 18.97, 19.00, 19.03, 19.06, 19.09, 19.12, 19.15, 19.18, 19.21, 19.24, 19.27, 19.30, 19.33, 19.36, 19.39, 19.42, 19.45, 19.48, 19.51, 19.54, 19.57, 19.60, 19.63, 19.66, 19.69, 19.72, 19.75, 19.78, 19.81, 19.84, 19.87, 19.90, 19.93, 19.96, 19.99, 20.02, 20.05, 20.08, 20.11, 20.14, 20.17, 20.20, 20.23, 20.26, 20.29, 20.32, 20.35, 20.38, 20.41, 20.44, 20.47, 20.50, 20.53, 20.56, 20.59, 20.62, 20.65, 20.68, 20.71, 20.74, 20.77, 20.80, 20.83, 20.86, 20.89, 20.92, 20.95, 20.98, 21.01, 21.04, 21.07, 21.10, 21.13, 21.16, 21.19, 21.22, 21.25, 21.28, 21.31, 21.34, 21.37, 21.40, 21.43, 21.46, 21.49, 21.52, 21.55, 21.58, 21.61, 21.64, 21.67, 21.70, 21.73, 21.76, 21.79, 21.82, 21.85, 21.88, 21.91, 21.94, 21.97, 22.00, 22.03, 22.06, 22.09, 22.12, 22.15, 22.18, 22.21, 22.24, 22.27, 22.30, 22.33, 22.36, 22.39, 22.42, 22.45, 22.48, 22.51, 22.54, 22.57, 22.60, 22.63, 22.66, 22.69, 22.72, 22.75, 22.78, 22.81, 22.84, 22.87, 22.90, 22.93, 22.96, 22.99, 23.02, 23.05, 23.08, 23.11, 23.14, 23.17, 23.20, 23.23, 23.26, 23.29, 23.32, 23.35, 23.38, 23.41, 23.44, 23.47, 23.50, 23.53, 23.56, 23.59, 23.62, 23.65, 23.68, 23.71, 23.74, 23.77, 23.80, 23.83, 23.86, 23.89, 23.92, 23.95, 23.98, 24.01, 24.04, 24.07, 24.10, 24.13, 24.16, 24.19, 24.22, 24.25, 24.28, 24.31, 24.34, 24.37, 24.40, 24.43, 24.46, 24.49, 24.52, 24.55, 24.58, 24.61, 24.64, 24.67, 24.70, 24.73, 24.76, 24.79, 24.82, 24.85, 24.88, 24.91, 24.94, 24.97, 25.00, 25.03, 25.06, 25.09, 25.12, 25.15, 25.18, 25.21, 25.24, 25.27, 25.30, 25.33, 25.36, 25.39, 25.42, 25.45, 25.48, 25.51, 25.54, 25.57, 25.60, 25.63, 25.66, 25.69, 25.72, 25.75, 25.78, 25.81, 25.84, 25.87, 25.90, 25.93, 25.96, 25.99, 26.02, 26.05, 26.08, 26.11, 26.14, 26.17, 26.20, 26.23, 26.26, 26.29, 26.32, 26.35, 26.38, 26.41, 26.44, 26.47, 26.50, 26.53, 26.56, 26.59, 26.62, 26.65, 26.68, 26.71, 26.74, 26.77, 26.80, 26.83, 26.86, 26.89, 26.92, 26.95, 26.98, 27.01, 27.04, 27.07, 27.10, 27.13, 27.16, 27.19, 27.22, 27.25, 27.28, 27.31, 27.34, 27.37, 27.40, 27.43, 27.46, 27.49, 27.52, 27.55, 27.58, 27.61, 27.64, 27.67, 27.70, 27.73, 27.76, 27.79, 27.82, 27.85, 27.88, 27.91, 27.94, 27.97, 28.00, 28.03, 28.06, 28.09, 28.12, 28.15, 28.18, 28.21, 28.24, 28.27, 28.30, 28.33, 28.36, 28.39, 28.42, 28.45, 28.48, 28.51, 28.54, 28.57, 28.60, 28.63, 28.66, 28.69, 28.72, 28.75, 28.78, 28.81, 28.84, 28.87, 28.90, 28.93, 28.96, 28.99, 29.02, 29.05, 29.08, 29.11, 29.14, 29.17, 29.20, 29.23, 29.26, 29.29, 29.32, 29.35, 29.38, 29.41, 29.44, 29.47, 29.50, 29.53, 29.56, 29.59, 29.62, 29.65, 29.68, 29.71, 29.74, 29.77, 29.80, 29.83, 29.86, 29.89, 29.92, 29.95, 29.98, 30.01, 30.04, 30.07, 30.10, 30.13, 30.16, 30.19, 30.22, 30.25, 30.28, 30.31, 30.34, 30.37, 30.40, 30.43, 30.46, 30.49, 30.52, 30.55, 30.58, 30.61, 30.64, 30.67, 30.70, 30.73, 30.76, 30.79, 30.82, 30.85, 30.88, 30.91, 30.94, 30.97, 31.00, 31.03, 31.06, 31.09, 31.12, 31.15, 31.18, 31.21, 31.24, 31.27, 31.30, 31.33, 31.36, 31.39, 31.42, 31.45, 31.48, 31.51, 31.54, 31.57, 31.60, 31.63, 31.66, 31.69, 31.72, 31.75, 31.78, 31.81, 31.84, 31.87, 31.90, 31.93, 31.96, 31.99, 32.02, 32.05, 32.08, 32.11, 32.14, 32.17, 32.20, 32.23, 32.26, 32.29, 32.32, 32.35, 32.38, 32.41, 32.44, 32.47, 32.50, 32.53, 32.56, 32.59, 32.62, 32.65, 32.68, 32.71, 32.74, 32.77, 32.80, 32.83, 32.86, 32.89, 32.92, 32.95, 32.98, 33.01, 33.04, 33.07, 33.10, 33.13, 33.16, 33.19, 33.22, 33.25, 33.28, 33.31, 33.34, 33.37, 33.40, 33.43, 33.46, 33.49, 33.52, 33.55, 33.58, 33.61, 33.64, 33.67, 33.70, 33.73, 33.76, 33.79, 33.82, 33.85, 33.88, 33.91, 33.94, 33.97, 34.00, 34.03, 34.06, 34.09, 34.12, 34.15, 34.18, 34.21, 34.24, 34.27, 34.30, 34.33, 34.36, 34.39, 34.42, 34.45, 34.48, 34.51, 34.54, 34.57, 34.60, 34.63, 34.66, 34.69, 34.72, 34.75, 34.78, 34.81, 34.84, 34.87, 34.90, 34.93, 34.96, 35.00, 35.03, 35.06, 35.09, 35.12, 35.15, 35.18, 35.21, 35.24, 35.27, 35.30, 35.33, 35.36, 35.39, 35.42, 35.45, 35.48, 35.51, 35.54, 35.57, 35.60, 35.63, 35.66, 35.69, 35.72, 35.75, 35.78, 35.81, 35.84, 35.87, 35.90, 35.93, 35.96, 36.00, 36.03, 36.06, 36.09, 36.12, 36.15, 36.18, 36.21, 36.24, 36.27, 36.30, 36.33, 36.36, 36.39, 36.42, 36.45, 36.48, 36.51, 36.54, 36.57, 36.60, 36.63, 36.66, 36.69, 36.72, 36.75, 36.78, 36.81, 36.84, 36.87, 36.90, 36.93, 36.96, 37.00, 37.03, 37.06, 37.09, 37.12, 37.15, 37.18, 37.21, 37.24, 37.27, 37.30, 37.33, 37.36, 37.39, 37.42, 37.45, 37.48, 37.51, 37.54, 37.57, 37.60, 37.63, 37.66, 37.69, 37.72, 37.75, 37.78, 37.81, 37.84, 37.87, 37.90, 37.93, 37.96, 38.00, 38.03, 38.06, 38.09, 38.12, 38.15, 38.18, 38.21, 38.24, 38.27, 38.30, 38.33, 38.36, 38.39, 38.42, 38.45, 38.48, 38.51, 38.54, 38.57, 38.60, 38.63, 38.66, 38.69, 38.72, 38.75, 38.78, 38.81, 38.84, 38.87, 38.90, 38.93, 38.96, 39.00, 39.03, 39.06, 39.09, 39.12, 39.15, 39.18, 39.21, 39.24, 39.27, 39.30, 39.33, 39.36, 39.39, 39.42, 39.45, 39.48, 39.51, 39.54, 39.57, 39.60, 39.63, 39.66, 39.69, 39.72, 39.75, 39.78, 39.81, 39.84, 39.87, 39.90, 39.93, 39.96, 40.00, 40.03, 40.06, 40.09, 40.12, 40.15, 40.18, 40.21, 40.24, 40.27, 40.30, 40.33, 40.36, 40.39, 40.42, 40.45, 40.48, 40.51, 40.54, 40.57, 40.60, 40.63, 40.66, 40.69, 40.72, 40.75, 40.78, 40.81, 40.84, 40.87, 40.90, 40.93, 40.96, 41.00, 41.03, 41.06, 41.09, 41.12, 41.15, 41.18, 41.21, 41.24, 41.27, 41.30, 41.33, 41.36, 41.39, 41.42, 41.45, 41.48, 41.51, 41.54, 41.57, 41.60, 41.63, 41.66, 41.69, 41.72, 41.75, 41.78, 41.81, 41.84, 41.87, 41.90, 41.93, 41.96, 42.00, 42.03, 42.06, 42.09, 42.12, 42.15, 42.18, 42.21, 42.24, 42.27, 42.30, 42.33, 42.36, 42.39, 42.42, 42.45, 42.48, 42.51, 42.54, 42.57, 42.60, 42.63, 42.66, 42.69, 42.72, 42.75, 42.78, 42.81, 42.84, 42.87, 42.90, 42.93, 42.96, 43.00, 43.03, 43.06, 43.09, 43.12, 43.15, 43.18, 43.21, 43.24, 43.27, 43.30, 43.33, 43.36, 43.39, 43.42, 43.45, 43.48, 43.51, 43.54, 43.57, 43.60, 43.63, 43.66, 43.69, 43.72, 43.75, 43.78, 43.81, 43.84, 43.87, 43.90, 43.93, 43.96, 44.00, 44.03, 44.06, 44.09, 44.12, 44.15, 44.18, 44.21, 44.24, 44.27, 44.30, 44.33, 44.36, 44.39, 44.42, 44.45, 44.48, 44.51, 44.54, 44.57, 44.60, 44.63, 4

e fluorescence)이고, Fm은 형광도 최대치 (maximum yield fluorescence)임),

□: 애생형 ■: *ore4*

도 2b는 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에서 엽록소 함량의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이고,

□: 애생형 ■: *ore4*

도 2c는 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에서 막 이온 유출 정도의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이고 (막 이온 유출 정도는 총 전도율에 대한 최초 전도율의 % 비율로 나타냄),

□: 애생형 ■: *ore4*

도 2d는 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에서 잎의 발생기간 동안 시간에 따른 노화 관련 유전자 (senescence associated genes; SAGs) 및 기타 광합성 관련 유전자의 발현 양상을 노던 블렛 분석으로 확인한 결과이고, CAB : 엽록소 a/b결합 단백질(chlorophyll a/b binding protein)

RBCS: 리불로스 이인산 카르복시화효소 소단위체(ribulose biphosphate carboxylase small subunit)

SAG12 : 노화 유전자 (senescence-associated gene 12)

도 3은 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에 노화의 시작 및 진행에 영향을 미치는 암(dark) 처리 후, 잎 수명의 변화를 광합성 효율(A)과 엽록소 함량(B)으로 나타낸 그래프이고,

□: 애생형 ■: *ore4*

도 4는 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에 노화의 시작 및 진행에 영향을 미치는 식물 호르몬이 ABA (abscisic acid) (도 4a), MeJA (methyl jasmonate) (도 4b), 에틸렌 (ethylene) (도 4c)을 각각 처리한 후, 잎 수명의 변화를 광합성 효율과 엽록소 함량으로 나타낸 그래프이고,

검은 막대 : 식물 호르몬 미처리

흰 막대 : 식물 호르몬 처리

도 5a는 *ore4* 변이형으로서 T-DNA 삽입된 RPS17 유전자를 나타낸 것으로, *ore4* 변이형에서 T-DNA 삽입 위치와 그 방향을 도식적으로 나타낸 그림이고 (전사방향은 RPS17 유전자 구조 아래 화살표로 표시),

LB ; 좌측 경계(Left boarder) RB ; 우측 경계(Right boarder)

도 5b는 애기장대 애생형 및 수명연장 변이형인 *ore4*에서 RPS17 유전자의 발현 양상을 노던 블렛 분석으로 확인한 결과이고,

도 6은 애생형과 *ore4* 변이체에서 잎의 무게의 변화를 나타낸 그래프이다.

□: 애생형 ■: *ore4*

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 잎 수명 조절 유전자 *ORE4*, 상기 유전자의 돌연변이형으로서 식물의 노화와 관련된 각종 생리적, 생화학적 변화를 감소시켜 식물의 수명을 연장하는 변이형 유전자 *ore4* 및 이들 유전자의 이용에 관한 것이다.

식물의 노화 억제는 그 자체로서의 학문적 중요성뿐만 아니라 작물의 생산성이나 수확 후 저장 효율에 있어서의 개량 가능성 때문에 산업적으로도 중요성이 높다. 이에 따라 식물 노화 현상을 밝히기 위한 유전학적, 분자 생물학적, 생리학적 및 생화학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 수명 연장 돌연변이를 이용한 유전자 탐색 및 기능에 대한 연구는 노화 진행 속도에 영향을 주는 신호 전달 경로를 밝힐 뿐만 아니라 식물 생산성 향상 및 추수 전후의 저장 효율 증가와 같은 실용적 문제 해결에 중요한 실마리를 제공한다.

노화 (senescence)는 식물이 일생을 거치는 동안 겪게 되는 마지막 단계로 노화의 개시는 식물 발달 단계에 있어 급격한 전환점이라 할 수 있으며, 이 기간 동안 세포들은 물질 대사 및 세포 구조에 있어서 극적인 변화를 거치게 된다. 이러한 식물체 변화에 있어서 시작적으로 나타나는 대표적인 현상으로는 엽록소가 파괴되고 다른 색소가 생성되면서 나타나는 단풍을 들 수 있다. 상기 단풍기간 동안 발생하는 엽록소 파괴는 엽록체 붕괴, 그리고 광합성이나 단백질 제조와 같은 동화 작용 활성 (anabolic activity)의 감소와 함께 발생한다. 또 이와 반대로 이 기간동안 많은 수의 가수 분해 효소가 유도되면서 핵산 분해 (nucleic acid breakdown)나 단백질 분해 (proteolysis)와 같은 이화 작용 (catabolism)이 활성화된다 (Matile P. et al., In Crop Photosynthesis: Spatial and temporal Determinant, Elservier 41 3-440, 1992; Nooden L.D. et al., Senescence and aging in Plant, Academic press, 1988; Thiman K.V. et al., The senescence of leaves, CRC press, 85-115, 1980). 그러나, 식물 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 겨울철에 성장 기관의 양분을 생식 기관으로 이동시키는 등, 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전 형질이라고 생각되고 있다.

노화는 일련의 연속된 생화학적 생리학적 현상의 진행으로 결국 세포, 기관 및 전체 개체를 죽음으로 이끈다 (Matile P. et al., In Crop Photosynthesis: Spatial and temporal Determinant, Elservier 413-440, 1992; Nooden L.D. et al., Senescence and aging in Plant, Academic press, 1988; Thiman K.V. et al., The senescence of leaves, C

해서는 유전자에 의해 예정된 프로그램에 따라 진행된다는 유전자설과, 생체 내에서 반복적으로 발생하는 정보 전달 오류 또는 단백질 합성 과정에서의 오류 축적에 따른 것이라는 오류 축적설로 크게 대별되는데, 최근에는 노화가 유전자에 의해서 결정된다는 유전자설이 설득력을 얻고 있다. 따라서 식물 노화에 있어서 노화에 관련된 유전자의 클로닝 및 그 유전자 기능의 탐색은 노화 과정의 연구 및 이의 조절을 위해 매우 중요한 수단이 될 수 있다. 그러나, 이러한 학문적 그리고 실용적 중요성에도 불구하고 식물 노화에 대해서는 아직도 많은 부분이 밝혀지지 않은 상태이다. 지금 까지 식물의 노화에 관련된 연구들은 주로 식물 호르몬에 관련된 보고가 주류를 이루고 있으며, 분자생물학적 연구가 시작된 것은 최근의 일이다.

식물 생장 호르몬(사이토카닌; Cytokinin)은 생리학적으로 노화를 지연시킬 수 있는 호르몬으로 알려져 있어, 노화 관련 유전자 조절을 통한 사이토카닌의 분비를 조절하여 노화를 지연시키려는 연구가 진행되어 왔으나, 호르몬의 영향으로 식물의 다른 생리 작용에 영향을 미치는 문제가 있었다. 최근에 이러한 문제점을 해결하여 노화 특이적인 SA G12 유전자의 프로모터에 IPT 유전자를 연결하여 특정 노화 단계에서 식물 생장 호르몬의 합성이 조절되게 함으로써, 노화의 진행을 지연시켜, 50% 이상의 생산성 증가를 이루면서도, 개화시기나 다른 변화가 거의 없게 하는데 성공하였다 (Gan S. et al., *Science* 22:1986-1988, 1995). 이외에 현재까지 노화 지연 식물체의 개발은 주로 토마토의 과실 숙성을 대상으로 하여 노화에 중요한 역할을 하는 화학물질인 에틸렌(ethylene)의 합성을 억제하거나, 세포내 에틸렌의 양을 줄이는 방법이 시도되어 왔다 (Klee et al., *Plant Cell*, 3(11):1187-93, 1991; Oelleret al., *Science*, 18:254(5030):437-9, 1991; Piction et al., *Plant Physiol.* 103(4): 1471-1472, 1993).

노화를 지연시키고자 하는 분자생물학적 연구는 주로 노화과정에서 일어나는 생화학적 변화와 관련된 활성을 갖거나 신호전달 체계에 관여하는 관련 유전자의 조작에 초점이 맞춰져 있다. 토마토의 경우, 안티센스 DNA (antisense DNA)를 이용해 세포벽 분해와 관련된 유전자 발현을 막아 토마토의 연화를 방지하여 토마토의 운송성과 저장성을 증가시키는 방법이 보고된 바 있으며 (Giovannoni et al., *Plant Cell* 1(1):53-63, 1989), 지질 분해에 관련되는 인지질 분해효소 D (phospholipase D)를 안티센스 DNA로 발현을 저해할 경우 식물 호르몬에 의한 노화가 지연된다는 보고도 있다 (Fan et al., *Plant Cell* 9(12):2183-96, 1997).

그러나 식물 노화를 보다 직접적으로 조절할 수 있는 방법은 노화와 함께 발현이 변화하는 유전자 분석을 통한 분자 생물학적 연구와 노화관련 돌연변이를 분리, 분석하는 유전학적 연구를 통해 얻을 수 있다.

기존의 보고에 의하면 애기장대의 과일 숙성기나 꽃의 노화과정에서 에틸렌 수용체의 발현이 조절되고 (Payton S. et al., *Plant Mol. Biol.* 31(6):1227-1231, 1996), 잎의 노화과정에서 *c/p* 유전자 발현이 조절된다 (Nakabayashi K. et al., *Plant Cell Physiol.* 40(5):504-514, 1999)고 알려져 있다. 최근에는 애기장대 변이형을 이용한 잎 노화 과정에 관련된 유전자 탐색(Oh S. A. et al., *Plant Mol. Biol.* 30(4):739-54, 1996) 및 이와 관련된 3군데 유전자 자리 (Oh S. A. et al., *The Plant Journal*, 12(3):527-535, 1997), 노화 관련 유전자인 *sen1* 프로모터 활성 (Oh S. A. et al., *Journal of Plant Physiol.* 151:339-345, 1997) 등이 보고된 바 있으나, 아직까지 직접적으로 노화를 조절하는 유전자 및 역할에 관한 분자 생물학적 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 발명자들은 유전학적으로 장점이 많은 애기장대 중에서 잎의 수명이 연장되어 있는 변이체를 찾아 수명 연장에 관계되는 유전자를 탐색하고자 노력한 결과, T-DNA 가 삽입된 돌연변이들 속에서 잎의 수명이 야생형에 비해 연장된 돌연변이체를 찾아내고 이 변이체에 대해 해당 유전자를 탐색함으로써, 상기 노화 관련 유전자가 염록체 리보솜의 작은 서브유닛을 암호화하는 850개의 핵산으로 이루어진 유전자임을 확인하고 상기 유전자를 *ORE4*로 명명하였다. 또한 이 유전자의 돌연변이형인 *ore4*의 경우 애기장대의 수명이 크게 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 식물의 수명을 조절할 수 있는 유전자 및 수명이 연장된 형질을 나타내는 상기 유전자의 변이형 유전자를 제공하는 것이다. 구체적으로 본 발명은 노화 진행 속도에 영향을 주는 신호전달 경로를 밝힐 수 있을 뿐만 아니라 형질전환을 통해 식물 생산성 향상 및 추수 전후의 과실의 저장 효율 증가와 같은 실용적 문제를 해결할 수 있는 신규 노화관련 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 야생형에 비해 현저히 잎의 수명이 연장된 변이형 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 탐색된, 노화 조절에 관여하는 유전자 *ORE4* 및 상기 유전자로부터 발현되는 *ORE4* 단백질을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 노화 조절 유전자 또는 단백질을 이용하여 식물체의 노화와 관련된 유전자 또는 노화를 억제할 수 있는 물질을 탐색하는 방법을 제공한다.

본 발명의 잎 수명 조절 유전자 *ORE4*는 염록체 리보솜의 작은 서브유닛 단백질 17(chloroplast ribosome small subunit 17, RPS17)을 암호화하는데 이러한 각각의 서브유닛은 정상적 기능을 갖는 리보솜 조합을 위해 동일한 양으로 요구되며, 식물에 있어 염록체는 정상적인 식물 노화 진행 단계에서 활성 산소 종(Reactive oxygen species)을 조절될 수 있는 한계 이상으로 다량 발생시켜 세포에 산화적 손상을 입히게 된다.

아울러, 본 발명은 *ORE4*의 유전자의 발현을 낮추도록 유전공학적으로 조작된 변이형 *ore4* 유전자를 제공한다. 변이형 *ore4* 유전자를 만드는 방법은 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis) 또는 안티센스 억제(antisense suppression) 등과 같이 당업계에 널리 알려진 유전자의 발현억제방법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 *ORE4* 유전자의 상위

키는 형질을 나타내며, 식물체에 변이형 *ore4* 유전자를 형질전환시키거나 식물체의 *ORE4* 유전자를 직접 조작하여 변이형으로 만듬으로써 수명을 연장시키는 방법도 본 발명의 범위에 속한다.

본 발명의 변이형 유전자 *ore4*를 갖는 식물체는 엽록체 리보솜의 작은 서브유닛 단백질 17의 부족으로 완전한 리보솜 조합체를 만들 수 없고 정상적 기능을 갖는 엽록체를 이를 수 없게 됨으로써 야생형에 비해 감소된 광합성 효율을 보이며 낮은 활성 산소 종의 생산으로 잎의 수명이 연장된다.

본 발명에서 'ore'란 오래 산다는 의미로 식물의 수명 조절에 관여하는 유전자, 단백질 또는 그로부터 발현되는 형질을 의미하기 위해 본 발명자에 의해 정의된 것이다. 구체적으로, 'ORE4 유전자' 또는 'ORE4 단백질'은 각각 본 발명에서 탐색된 수명 조절 유전자 또는 단백질을 지칭하며, '변이형 *ore 4* 유전자'는 *ORE4*의 유전자의 발현을 낮추도록 유전공학적으로 조작된 변이형 유전자를 의미한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 수명 조절에 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여 먼저 수명이 연장된 형질을 나타내는 돌연변이체를 선별하였다. 이를 위해 식물의 유전학 및 분자생물학적 연구를 위한 재료로 많이 사용되는 애기장대를 실험 식물로 하였는데, 애기장대는 5개의 염색체내에 약 125 Mbp 정도로 크기가 작고 거의 완전히 해독된 게놈을 가지고 있으며, 이에 대해 상세한 유전학적 및 물리적 지도가 완성되어 있고, 일생이 짧은 반면 많은 씨앗을 생산하고, 경작 및 형질 전환이 용이하다는 장점을 가져 식물의 유전학 모델 재료로 많이 이용된다 (<http://www.arabidopsis.org>).

본 발명에서는 애기장대를 대상으로 잎 수명이 연장된 변이체를 선별하기 위해 T-DNA를 삽입시켜 돌연변이를 유도한 다음, 성장한 개체들 중에서 육안으로 잎의 황화 속도가 느린 개체를 선발하고, 이들의 수명 연장 형질을 확인하기 위해 잎 생존률, 엽록소 함유량, 광합성 효율 및 이온 유출 속도 변화를 조사하였다. 상기에서 선발된 변이체를 *ore4* 변이체로 명명하였으며, 이의 형질을 야생형과 비교한 결과, 야생형은 41 DAG(DAG; days after germination)에 이미 잎의 노화가 시작되어 4번째 잎이 완전히 황화되는 반면, 변이형 *ore4*는 53 DAG에서도 여전히 많은 양의 엽록소를 가지고 있었다. 한편, 노화 진행의 또 다른 지표인 광합성 활성 감소 및 막 이온 유출 정도에 있어서도, *ore4* 변이체는 야생형에 비해 노화가 더디게 진행되었다.

일반적으로 잎의 노화는 유전자 내에 이미 예정되어 있는 것으로 받아들여 지고 있지만, 노화의 시작과 진행은 앱시스산(abscisic acid; ABA), 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate; MeJA) 및 에틸렌(ethylene)과 같은 식물호르몬에 의해 변화될 수 있다고 알려져 있다 (Hensel et al., Plant Cell 5:553, 1993). 따라서 이러한 식물 호르몬의 처리에 따른 *ore4* 변이체에서의 잎 수명 변화를 조사하기 위해 각각 ABA, MeJA 및 에틸렌을 처리한 후 노화의 진행을 엽록소 함량 및 광합성 활성 조사를 통해 확인하였다. 그 결과, 야생형과 *ore4* 돌연변이체에서 광합성 활성과 엽록소 함량의 차이를 보이지 않았다. 이로 미루어 보아 *ORE4*는 이러한 호르몬에 의해 촉진되는 노화과정에 관여하지 않음으로써 단지 수명의 존적인 방법을 통한 노화과정에 관여함을 알 수 있다.

한편, 본 발명의 실시예에서는 상기 *ore4* 변이체에서 수명의 연장이 생리적 수준뿐만 아니라 분자수준에서도 작용하는 것인지 확인하기 위하여, 각종 노화관련 유전자들의 발현 양상을 노던 블렛 분석 (northern blotting)을 통해 조사하였다. 예를 들어 광합성과 같은 동화 활성(anabolic activity) 및 자가 유지 활성(self-maintenance gene activity)은 잎 성장 시에는 증가하다가 노화단계가 되면 감소하게 된다 (Nam et al., Curr. Opin. Biotech. 8:200, 1997). 야생형의 경우 엽록소 a/b 결합 단백질 (chlorophyll a/b binding protein)과 같은 광합성 관련 유전자 발현은 노화 진행에 비례하여 감소하게 된다. 그러나 본 발명의 *ore4* 변이체에서는 이들 유전자의 발현에 거의 차이가 없었다. 한편 각종 노화 관련 유전자 SAG12의 발현은 야생형에서 노화의 진행에 따라 증가한다. 그러나 동일한 시간에 *ore4* 변이형에서는 상기 노화 관련 유전자의 발현이 거의 증가하지 않은 것으로 확인되었다. 이러한 사실은 *ore4* 변이체의 수명 연장 효과가 생리적 수준은 물론 분자적 수준에서 나타나는 효과임을 의미한다.

상기와 같이 식물의 수명 조절에 관여하는 유전자를 찾기 위해 T-DNA가 삽입된 돌연변이체들에서 분리된 *ore4* 변이형을 유전적 분석을 한 결과 한 개의 T-DNA의 삽입에 의해서 *ore4* 돌연변이가 유도된 것을 확인할 수 있었다. 인버스 중합효소 연쇄 반응 (Inverse Polymerase Chain Reaction)을 통해 T-DNA 삽입에 인접한 게놈 DNA를 분리한 결과 T-DNA가 RPS17 유전자의 번역시작 사이트로부터 상위 758 bp에 삽입되어 이 유전자가 발현되지 않음을 노던 블렛 분석을 통해 확인하였다. 이로부터 RPS17 유전자를 포함하는 2.8 kb 절편을 서브 클로닝 하였으며 상기 절편이 *ore4* 변이체를 보완(complementation)하기에 충분함을 확인하였다. 본 발명에서 제공하는 *ORE4* 유전자의 염기 서열 및 *ORE4* 단백질의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타나 있다.

ORE4 유전자인 엽록소 RPS17 유전자가 암호화하는 엽록소 리보솜 작은 서브 유닛 단백질은 리보솜 조합을 위해 다른 서브유닛들과 같은 양으로 요구되기 때문에 공통적인 기작에 의해 조절된다. RPS17 유전자는 애기장대에서 하나의 사본 수 (copy number)로 존재하므로 *ore4* 변이형은 특정 광합성 요소가 아닌 많은 종류의 광합성 요소들의 발현을 감소시킴으로써 광합성의 전체적인 속도를 느리게 할 것이다. 이러한 광합성 능력 감소를 확인하기 위해 야생형과 변이형의 16 DAE(Day after emergence)에서 4번째 좌엽의 엽록소 형광율을 측정한 결과 *ore4* 변이형의 광합성계2 (Photosystem II)가 일부 손상되어 그 기능이 감소되어 있음을 확인 할 수 있었다. 식물에 있어 광합성 과정은 유일한 에너지 공급 수단으로서 이러한 과정에 관여하는 산화/환원 반응동안 생성되는 활성 산소 종들이 유출되어 즉시 처리되지 못할 경우 세포 손상을 일으키며 특히 이러한 활성 산소 종들은 식물을 포함하여 인간까지 매우 다양한 종의 노화 과정에서 산화적 상해를 일으키는 위험 요소로서 오랫동안 간주되어 왔다. 결국 *ore4* 변이형에서 나타나는 낮은 광합성율은 야생형에 비해 낮은 세포내 활성 산소를 생산함을 확인시켜준다. 더욱이 20 DAE에서 변이형의 4번째 좌엽의 평균 무게가 야생형의 67%에 미치는 것으로 보아 *ore4* 변이형에서 잎의 성장과 광합성 속도 사이에 상호 관계가 있음을 최종 확인하였다.

본 발명의 *ORE4* 단백질이 애기장대의 잎 수명에 영향을 미치는 기작은 다음과 같이 추정될 수 있다. 이 *ORE4* 단백

산이 저해된 결과 전반적인 식물의 광합성 율이 감소되게 되는 것이다. 이러한 식물에서의 감소된 광합성 율은 대사 속도(metabolic rate)를 낮추고 결국 낮은 활성 산소 종의 생산으로 식물 잎의 노화를 지연시킬 것이다. 식물에 있어서 감소된 대사 속도와 노화 지연에 대해 알려진 바가 없다. 따라서 *ore4* 변이형의 연구는 에너지 평형(energy balance)과 노화의 역할에 대한 직접적인 유전학적 고찰을 제공할 것이다.

그러나, 본 발명에 의한 *ORE4* 유전자 및 단백질 또는 변이형 *ore4* 유전자에 의한 수명 조절 효과 또는 수명 연장 효과는 상기와 같은 이론에 의해 그 기작이 설명될 수 있지만, 상기 이론에 의해 구속되거나 이에 한정되어 의존하고자 하는 것은 아니다.

한편, 본 발명의 *ORE4* 유전자 및 *ORE4* 단백질은 식물의 노화 관련 유전자 또는 노화 억제 물질을 탐색하는 데에 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들어, *ORE4* 유전자와 염기 서열 등을 비교하여 높은 서열 상동성을 가진 유전자를 탐색하거나, 일부분을 탐침으로 하여, 노화 물질을 처리한 식물체로부터 추출한 RNA 또는 mRNA를 주형으로 하여 제조한 cDNA와 혼성화 반응을 수행함으로써 유사 유전자를 탐색할 수 있다. 또한 직접적으로 본 발명의 유전자와 결합하는 물질, 본 유전자의 발현을 억제 또는 활성화하는 물질을 탐색하거나, 또는 *ORE4* 단백질과의 결합양상을 분석함으로써 노화 억제 물질을 탐색하는 용도로 사용될 수도 있다. 구체적인 방법으로는 당업계에 잘 알려진 DNA 칩, 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 및 노던 블로트 등을 포함하는 다양한 방법으로 분석을 수행할 수 있다.

또한, ORE4 단백질을 이용할 때는 효소 면역 측정 (ELISA), 단백질 침 및 2-D 겔 분석 등을 포함하는 그룹으로부터 선택된 방법으로 ORE9 단백질 발현 양상을 확인함으로써 분석을 수해할 수 있다.

한편, 본 발명은 *ore4* 변이형 유전자로 식물체를 형질 전환시킴으로써 식물의 수명을 연장시키는 방법을 제공한다. 상기 변이형 유전자로 형질 전환된 식물체를 제조하는 방법은 공지의 식물체 형질전환 방법을 이용할 수 있는데, 예를 들어 상기 변이형 *ore4* 유전자를 도입한 식물 형질 전환용 이원 백터를 이용하여 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)에 의해 매개되는 형질 전환법을 이용하거나, T-DNA 부위를 포함하지 않는 백터를 이용하는 경우 전기 천공법 (electroporation), 입자 충격법 (microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법 (polyethyleneglycol-mediated uptake) 등을 이용할 수 있다.

또한, 본 발명은 식물체의 *ORE4* 유전자를 직접 유전공학적으로 조작하여 변이형 *ore4* 유전자로 만듬으로써 식물의 수명을 연장시키는 방법을 제공한다. 변이형 *ore4* 유전자를 만드는 방법은 예컨대, 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis) 또는 안티센스 억제(antisense suppression) 등과 같이 당업계에 널리 알려진 유전자의 발현억제방법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 *ORE4* 유전자의 상위 지역에 T-DNA를 삽입시킴으로써 변이형 *ore4* 유전자를 만든다

본 발명의 방법에 의해 수명이 연장될 수 있는 식물로는 상치, 배추, 감자, 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물 (dicotyledonous plant)이 모두 이용될 수 있으며, 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 노화에 따른 품질 저하가 급격히 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 잎이 주된 상품으로 거래되는 식물 등에 적용할 경우 저장 효율을 높이는 데 효과적이다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시례 1> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 수명 연장 돌연변이체의 선발

애기장대 야생형인 WS의 종자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이들을 약 23°C로 온도가 조절되는 온실에서 성장 시켰으며, 연령 의존적인 식물 노화에 따른 엽록소의 감소로 인해 잎이 황화되는 정도를 육안으로 관찰하여 야생형에 비해 잎의 황화 속도가 느린 1개의 개체를 선발하여, 상기 변이체를 오래 산다는 의미로 *ore4*로 명명하였다. 이에 대해 잎의 노화 정도를 측정하기 위한 생체표지(biomarker)로 사용되고 있는 생화학적 분석(엽록소의 함량 분석, 광화학적 효율 분석)의 결과로부터 실제로 이 돌연변이 식물이 기능상의 노화 저연 식물(functional stay-green)임을 확인하였다. 상기에서 선발된 수명 연장 변이체 및 대조군으로 사용될 야생형 개체들은 이후의 실험에 사용하기에 앞서 22°C, 16시간 명 조건/8시간 암 조건으로 환경이 조절되는 생장실(growth room, Korea Instrument Inc.)에서 생장 시켰으며, 실험에는 3번 또는 4번 좌엽을 사용하였다. 야생형의 경우 41DAG에서 좌엽의 노화가 이미 시작되어 진행이 되는 반면 *ore4*의 좌엽은 여전히 다량의 엽록소를 함유하고 있으며 53DAG에서 조차 높은 엽록소 함량을 보였다.(도 1a/b 참조)

< 실시예 2 > 수명연장 변이체 ore4의 형질 발현 조사

ore4 변이체의 수명 연장 형질을 확인하기 위하여 *ore4*의 잎 엽록소 함량, 광합성 활성 및 막 이온 유출 정도를 측정하여 야생형 애기장대의 결과를 비교하였다.

2-1) 광합성 활성

광합성 활성을 측정하기 위하여 오 등의 방법 (Oh S.A. et al., Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하였다. 우선 각 DAE의 잎을 15분간 암처리한 후 식물 효율 분석기 (Plant Efficiency Analyzer)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 광합성 활성은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PSII (photosystemII)의 광화학적 효율 (photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치 (maximum value of fluorescence; Fm)에 대한 최대 변형 형광도 (maximum variable fluorescence; Fv)의 비율 (Fv/Fm)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 좋음을 나타낸다. 그 결과, 야생형의 경우 36 DAE에서 어떤 광합성 효율도 보이지 않은 반면에 *ore4*의 경우 70% 이상 유지하고 있었다 (도 2a 참조).

2-2) 엽록소 함유량 측정

엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80°C, 95% 에탄올로 끓여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 648nm와 664nm의 흡광도로 측정하였으며, 잎의 중량 (fresh weight)에 대한 엽록소 농도로 표시하였다 (Vermon et al., Anal. Chem., 1961, 33, 1152-1162).

소의 양의 19%만을 유지한 반면, *ore4* 변이형의 경우 그 값의 80%를 유지하고 있었다 (도 2b 참조).

2-3) 막 이온 유출 정도 조사

막 이온 유출 정도는 잎으로부터 유출된 전해질을 측정함으로써 결정하였다. 애기장대 한 개체 당 2개의 잎을 채취하여 400mM 만니톨 (mannitol) 3 ml에 담그고 22°C에서 3시간 동안 가볍게 흔들어 준 뒤, 전도율 측정기 (conductivity meter SC-170)을 이용해 최초 전도율 (initial conductivity)을 측정하였다. 상기 시료를 10분 동안 끓인 후 총 전도율 (total conductivity)을 측정하였고, 전도율은 총 전도율에 대한 최초 전도율의 비율 (%)로 나타냈다. 그 결과, 막 이온의 유출은 야생형의 경우 28 DAE 이후 급격히 증가하였으며, *ore4*의 경우 36 DAE 이후 급격히 증가하는 양상을 나타냈다 (도 2c 참조).

이상의 결과들을 종합할 때, *ore4* 변이형은 일반 야생형에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명 연장의 효과는 엽록소 함량 감소, 광합성 활성 감소 및 막이온 유출 등으로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 야생형에 비해 늦게 나타나는 것으로부터 확인할 수 있다.

<실시예 3> *ore4* 변이체에서 노화 관련 유전자 발현

*ore4*가 노화관련 유전자 (senescence associated genes; SAGs) 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 잎 발생 (development) 과정동안 시간 경과에 따른 각 SAG 단백질들의 발현양상을 노던 블럿 (northern blot)을 통해 확인하였다. 시료는 야생형 잎을 기준으로 각각 완전 성숙, 10% 이하 엽록소 소실, 약 50% 엽록소 소실 시기인 16, 24, 28 DAE에서 전체 RNA를 추출하여 조사하였다. 각 레인 별로 10μg의 RNA를 로딩하였으며 탐침으로는 전장 (full-length) *ORE4* 유전자를 사용하였다. 광합성과 같은 동화 활성 (anabolic activity) 및 자가 유지 유전자 활성 (self-maintenance gene activity)은 잎 성장 시 증가하다가 노화 단계에서는 감소하는 것으로 알려져 있다 (H.G. Nam, Current Opin. Biotech. 8:200, 1997). 본 실험 결과에서도 이에 일치하는 결과가 확인되었는데, 야생형의 경우, 엽록소 a/b 결합 단백질 (chlorophyll a/b binding protein; CAB)과 같이 광합성에 관련된 유전자 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나, *ore4* 변이체에서는 이들 유전자의 발현 양상에 약간의 변화만 있을 뿐 거의 변하지 않았다. 한편, *SAG12*과 같은 노화 관련 유전자들의 발현 정도는 야생형이 시간이 지날수록 증가하는데 비해, 변이형에서는 동일한 시간에 발현 양상이 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 (도 2d 참조). 이러한 사실은 *ore4* 변이가 생리적 현상뿐만 아니라 분자 수준에서도 노화의 시작을 연기시켜 잎의 수명을 연장시킨다는 것을 의미한다.

<실시예 4> 암처리 및 식물 호르몬 처리에 따른 *ore4* 변이체의 잎 수명 변화

잎의 노화는 발생학적으로 예정되어 있는 것이라고 알려져 있지만, 또한 노화의 시작과 진행은 일정한 농도의 식물 생장 억제 물질인 앱시스산 (abscisic acid; ABA), 메틸 자스모네이트 (methyl jasmonate; MeJA) 및 에틸렌 (ethylene)과 같은 식물 호르몬 (phytohormone)에 의해 변화될 수 있다 (Hensel et al., Plant Cell 5:553, 1993; Weidhase et al., Physiol. Plant 69:161, 1987; Zeevaart et al., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:439, 1988). 우선 암처리를 하였을 때, 수명 변화를 광합성 활성 및 엽록소 함량 변화 측정을 통해 조사하였다. 또한 식물 호르몬 처리에 따른 *ore4* 변이체의 잎 수명 변화를 광합성 활성 및 엽록소 함량 변화 측정을 통해 조사하였다. 분리한 잎에 빛을 계속 쬐어주면서 50μM ABA 또는 50μM MeJA를 포함하는 3 mM 2-[N-몰포리노]-에탄술폰산 완충액 (2-[N-morpholinol]-ethanesulfonic acid; MES buffer, pH 5.8)에 부유시켰다. 에틸렌 처리는 5μM 에틸렌 가스를 포함하는 유리 상자 안에서 배양함으로써 수행하였다. 상기와 같은 식물 호르몬 처리는 계속적으로 빛을 쬐어주는 상태로 22°C에서 3일간 수행하였다. 이때 시료는 12 DAE에 있는 12개의 독립된 잎을 이용하였으며, 엽록소 함량 및 광합성 활성을 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과 암처리, ABA, MeJA, 및 에틸렌 처리 후 *ore4* 변이형의 잎 노화는 지연되지 않음을 확인함으로써 *ORE4*는 암처리 및 노화 촉진 호르몬에 의해 유도되는 노화 과정에는 관계하지 않음을 보여 주었다 (도 3 및 4 참조).

<실시예 5> *ORE4* 유전자 클로닝 및 서열분석

ore4 변이형은 초기에 T-DNA 삽입 돌연변이체들로부터 분리되었으며 유전적 분석을 통해 한 개의 T-DNA 삽입으로 나타나는 열성 돌연변이체임이 확인되었다. T-DNA 삽입에 인접한 게놈 DNA를 클로닝하기 위해 인버스 중합 효소 연쇄 반응을 수행하였다. 이는 *ore4* 돌연변이체의 게놈 DNA를 *Bgl* II 제한 효소로 반응 후 자기 결합 (self ligation) 시켰다. 여기에 5' acgtgggttctggcagctgga 3'과 5' ggccagcgtatcgctgctg 3'을 이용하여 T-DNA의 인접 서열을 분리하였다. 염기 서열 분석 결과 T-DNA가 RPS17 유전자의 번역 시작 상위 758 bp에 T-DNA가 삽입되었음을 알 수 있었다 (도 5a).

야생형과 돌연변이형에서 분리된 RNA를 사용한 노던 블럿 분석 결과 야생형에서만 850bp 정도의 전사체가 나타났으며 변이형에서는 이 전사체가 존재하지 않음을 확인하였다 (도 5b).

상기 RPS17 유전자를 포함하는 2.8kb 절편을 5' ttagatgaggctgccacggat 3'와 tccgactaccaattttgctc 3' 프라이머를 사용하여 pGTE 벡터에 서브클로닝하였으며, 상기 재조합벡터 pGTE-ORE4로 형질전환된 대장균을 2001년 8월 16일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (기탁번호: KCTC 10037BP).

잠재적 RPS17 유전자가 *ore4* 변이체에 있어서 수명 조절을 보완할 수 있는지 확인하기 위해, 상기 재조합벡터에 삽입되어 있는 RPS17 유전자를 포함하는 2.8kb 절편을 pCAMBIA 벡터로 옮긴 후 *ore4* 개체에 형질 전환하여 보완 실험을 수행하였다. 형질전환된 개체들을 T2세대에서 항생제 저항성 및 표현형을 관찰한 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 RPS17 유전자를 포함하는 절편이 변이체 *ore4*를 보완할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과 RPS17 유전자가 *ORE4* 임을 증명할 수 있었다.

[표 1]

유전자 도입(transgenes)에 의한 *ore4* 변이체 보완 (complementation) 실험

유저형	하이그로마이신 저항성	표현형
-----	-------------	-----

	Hygr ^r	Hygr ^s	+	-
야생형	-	-	25	0
ore4	-	-	0	25
ore4/RPS17-a	76	24	21	8
ore4/RPS17-b	134	52	28	8
ore4/RPS17-c	74	24	27	9

주) Hygr은 하이그로마이신에 대한 저항성, Hygs는 하이그로마이신에 대한 민감성, +는 야생형의 표현형, -는 노화지연의 표현형을 의미한다.

< 실시예 6 > 감소된 RPS17 발현으로 인한 잎 성장 저해

감소된 광합성 활동이 잎 성장의 저해를 일으킨다는 가설을 검증하기 위해 잎 성장 속도에 대한 ore4 변이형의 영향을 조사하였다. 야생형과 변이형의 4번째 좌엽의 무게를 4 DAE부터 20 DAE까지 측정한 결과 이 두 식물에서 좌엽의 무게가 유사하게 증가되었으나 변이형의 4번째 좌엽의 평균 무게가 20 DAE에서 야생형의 67%에 지나지 않았다 (도 6 참조). 따라서, ore4 변이형에서 광합성 속도와 잎 성장 사이에 상관 관계가 있음을 알 수가 있다.

발명의 효과

본 발명의 신규 노화 조절 유전자 ORE4 및 상기 유전자로부터 발현되는 ORE4 단백질은 식물의 노화 기작 연구, 노화 관련 유전자 또는 노화 억제 물질의 탐색 등에 유용하게 쓰일 수 있다. 또한 상기 유전자의 변이형인 ore4 유전자로 식물체를 형질전환시키거나 식물체의 ORE4 유전자 자체를 변이형으로 만듬으로써 식물의 수명을 연장시켜 생산성 향상 및 저장 효율 증대 등을 이를 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 식물의 수명 조절 단백질 ORE4.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리한 것을 특징으로 하는 식물의 수명 조절 단백질 ORE4.

청구항 3.

제 1항의 ORE4 단백질을 암호화하는 유전자.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 ORE4 유전자.

청구항 5.

제 3항의 식물의 수명 연장 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6.

제 5항에 있어서, ORE4 유전자를 포함하는 pGTE-ORE4 (기탁번호 : KCTC 10037BP)

청구항 7.

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 ORE4 유전자를 이용한 DNA 침, 노던 블로트 분석 또는 서던 블로트 분석에 의해 상기 유전자와의 서열 상동성 또는 혼성화 반응을 조사하는 것을 특징으로 하는 식물의 노화 조절 유전자를 탐색하는 방법.

청구항 8.

서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 ORE4 단백질을 이용한 단백질 침, 효소 면역 반응(ELISA) 또는 2-D 젤 분석에 의해 상기 단백질과의 결합 반응 또는 발현 양상을 조사하는 것을 특징으로 하는 식물의 노화 조절 단백질을 탐색하는 방법.

청구항 9.

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 ORE4 유전자의 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis) 또는 안티센스 억제(antisense suppression)에 의해 그 발현을 낮추도록 조작된 변이형 ore4 유전자로 식물을 형질전환시킴으로써 식물의 수명을 연장시켜 식물의 생산성 및 저장 효율을 증대시키는 방법.

청구항 10.

식물의 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 ORE4 유전자를 직접 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis) 또는 안티센스 억제(antisense suppression)에 의해 그 발현을 낮추도록 조작하여 변이형 ore4 유전자로 만듬으로써 식물의 수명을 연장시켜 식물의 생산성 및 저장 효율을 증대시키는 방법.

삭제

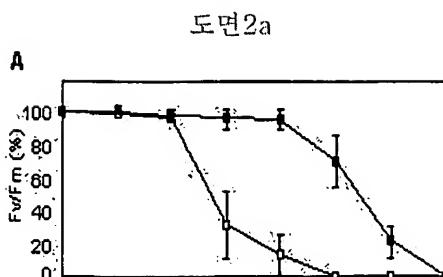
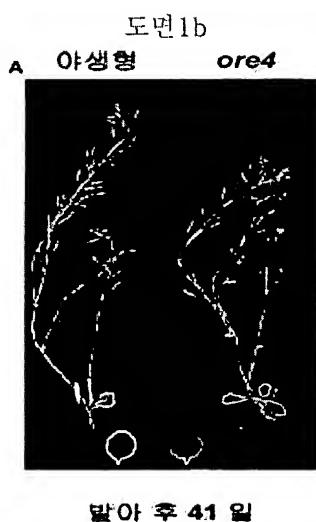
청구항 12.

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 변이형 *ore4* 유전자는 *ORE4* 유전자의 상위 지역에 T-DNA를 삽입시킴으로써 유전자가 발현되지 못하는 것을 특징으로 하는 방법.

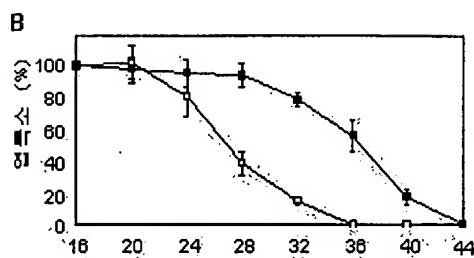
청구항 13.

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 식물은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 아라비돕시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 틀립을 포함하는 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톤페스큐, 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

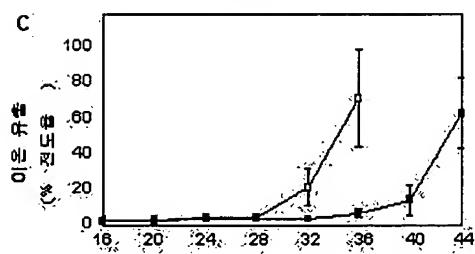
도면



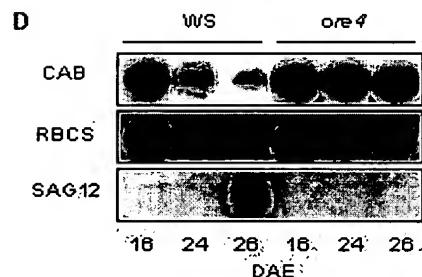
도면 2b



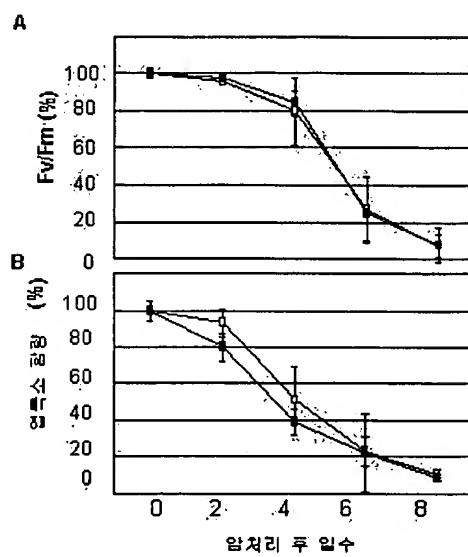
도면 2c



도면 2d

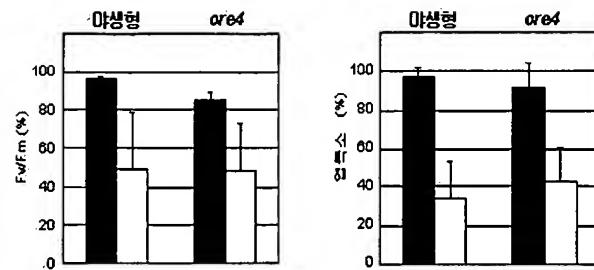


도면 3



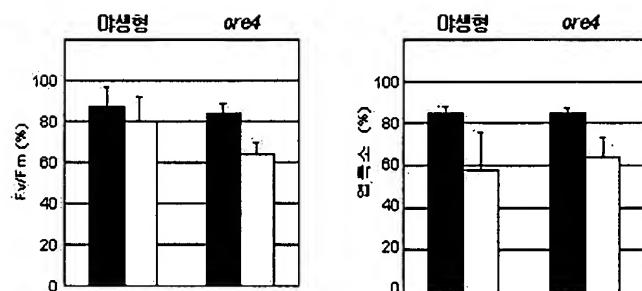
도면 4a

50 μ M ABA



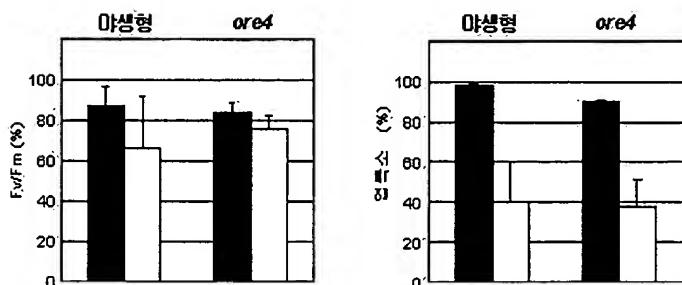
도면4b

50 μ M MeJA



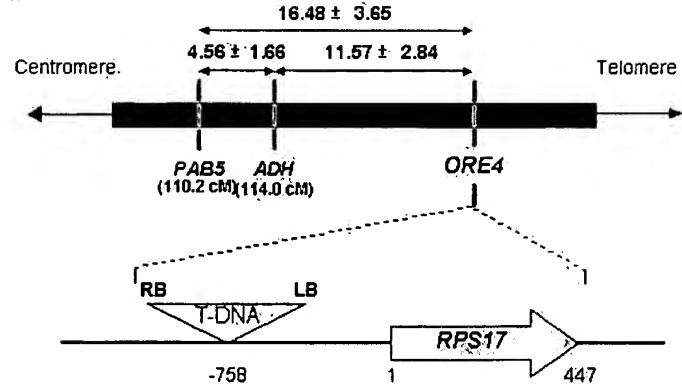
도면 4c

5 μ M Ethylene

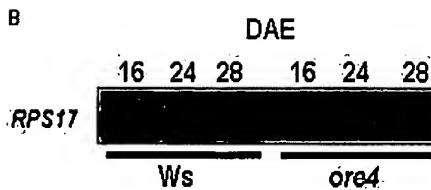


도면5a

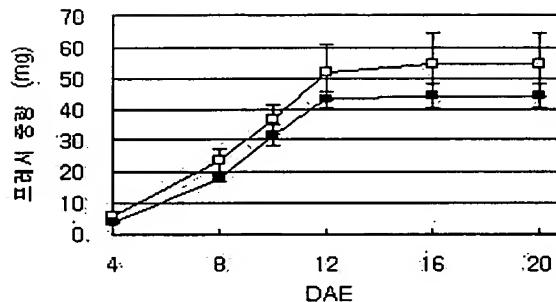
4



도면5b



도면6



<110> POSTECH FOUNDATION <120> Gene ORE4 which regulates leaf longevity in *Arabidopsis thaliana* and mutant genes thereof <160> 2 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 450 <212> DNA <213> *Arabidopsis thaliana* <220> <221> CDS <222> (1)..(447) <400> 1 atg ata acg tcg tcc cta acc tca tct ctg caa gct ctc aag ctt tcg 48 Met Ile Thr Ser Ser Leu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Le u Lys Leu Ser 1 5 10 15 tct ccg ttc gcc cat ggc tcc act cct ctc tca tct ctc tct aag ccc 96 Ser Pro Phe Ala His Gly Ser Thr Pro Leu Ser Ser Leu Ser Lys Pro 20 25 30 aat tcc ttc ccg a ac cac aga atg ccc gct tta gtt ccg gtc atc aga 144 Asn Ser Phe Pro Asn His Arg Met Pro Ala Leu Val Pro Val Ile Arg 35 40 45 gcc atg aaa ac g atg cag ggg cgc gtg gtg tgc gca acc agt gac aag 192 Ala Met Lys Thr Met Gln Gly Arg Val Val C ys Ala Thr Ser Asp Lys 50 55 60 act gtg gcg gtg gag gtg gtg agg ctg gct ccc cac ccc aag tac aag 240 Thr Val Ala Val Glu Val Val Arg Leu Al a Pro His Pro Lys Tyr Lys 65 70 75 80 agg cgc gtg agg atg aag aag tac caa gct cac gac ccc gat aat 288 Arg Arg Val Arg Met Lys Lys Lys Tyr Gln Ala His Asp Pro Asp Asn 85 90 95 cag t tc aag gtt ggc gac gtg gtc aga ctg gaa aag agc aga ccc atc 336 Gln Phe Lys Val Gly Asp Val Val Arg Leu Glu 100 105 110 ag Arg Leu Glu Lys Ser Arg Pro Ile t aag act aaa tca ttt gtg gcg ctt cct gtc atc gca agg gcc gcc 384 Ser Lys Thr Lys Ser Phe Val A Ia Leu Pro Val Ile Ala Arg Ala Ala 115 120 125 agg aaa gcc gaa gcc gga gga gat gaa ctc ctt ggc ctt ccc ttg gag 432 Arg Lys Ala Glu Ala Gly Gl y Asp Glu Leu Leu Gly Leu Pro Leu Glu 130 135 140 tct cag cag ccg gcg tag 450 Ser Gln Gln Pro Ala 145 <210> 2 <211> 149 <212> PRT <213> *Arabidopsis thaliana* <400> 2 Met Ile Thr Ser Ser Leu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser 1 5 10 15 Ser Pro Phe Ala His Gly Ser Thr Pro Leu Ser r Ser Leu Ser Lys Pro 20 25 30 Asn Ser Phe Pro Asn His A rg Met Pro Ala Leu Val Pro Val Ile Arg 35 40 45 Ala Met Lys Thr Met Gln Gly Arg Val Val Cys Ala Thr Ser Asp Lys 50 55 60 Thr Val Ala Val Glu Val Val Arg Leu Ala Pro His Pro Lys Tyr Lys 65 70 75 80 Arg Arg Val Arg Met Lys Lys Lys Tyr Gln Ala His Asp Pro Asp Asn 90 95 Gln Phe Lys Val Gly Asp Val Val Arg Leu Glu Lys Ser Arg Pro I 5 100 105 110 Ser Lys Thr Lys Ser Phe Val Ala Leu Pro Val Ile Ala Arg Ala Ala 115 120 125 Arg Lys Ala Glu Ala Gly Gly Asp Glu Leu Leu Gly Leu Pro Leu Glu 130 135 140 Ser Gln Gln Pro Ala 145